

Zakład Biochemii Farmaceutycznej
i Diagnostyki Molekularnej
z Pracownią Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki

tel/fax: +48 42 677-91-26
e-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Łódź, 28 grudnia 2023 r.

Ocena

dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr n. med. Rafała Krętowskiego w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne przygotowana na zlecenie Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 6 listopada 2023 r.

Informacje o Kandydacie

Dr n. med. Rafał Krętowski ukończył Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku w roku 2008 uzyskując tytuł zawodowy magistra analityki medycznej. W tym samym roku rozpoczął pracę w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku jako asystent naukowo-dydaktyczny, a od 2016 r. adiunkt naukowo-dydaktyczny.

W 2014r. w tej samej jednostce uzyskał stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna na podstawie rozprawy zatytułowanej „Regulacyjna rola białka opiekuńczego ORP150 w metabolizmie kolagenu w komórkach raka sutka linii MCF-7” , której promotorem była prof. dr hab. Marzanna Cechowska-Pasko.

Ocena dorobku naukowego i działalności badawczej przed uzyskaniem stopnia dr n. medycznych

Dorobek naukowy tego okresu (2010 – 2014) obejmuje 8 publikacji, z których 7 (P1-P7) posiada IF o łącznej wartości 11,718 i punktacji MEiN 135 zgodnej z rokiem opublikowania i 490 wg. listy z 2021 r. Pierwsza publikacja w dorobku Habilitanta z 2010 r została przedstawiona w Farmaceutycznym Przeglądzie Naukowym.

Ten cykl prac poświęcony jest ocenie wpływu stresu siateczki śródplazmatycznej, indukowanego niedoborem glukozy na syntezę i degradację kolagenu, na apoptozę i starzenie się w komórkach raka gruczołu sutkowego - linia MCF-7. Do najważniejszych osiągnięć w tym cyklu zaliczyć można wykazanie, że niedobór glukozy prowadzi do upośledzenia syntezy kolagenu, indukowania białka opiekuńczego ORP150, które chroni kolagen przed nadmierną jego degradacją oraz stymulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, aktywacji procesu autofagii i zahamowania procesu starzenia. Co ciekawe komórki kontrolne (fibroblasty skóry) w tych samych warunkach niedoboru glukozy ulegały procesowi starzenia (prace P8, P1 i P3 - zgodnie z przedstawionym wykazem osiągnięć naukowych).

W kolejnych pracach (P5 i P6) zbadano wpływ bortezomibu na apoptozę komórek raka gruczołu sutkowego linia MDA-MB-231 w odniesieniu do komórek kontrolnych, fibroblastów skóry ludzkiej (linia CRL-1474). Zaobserwowano jego silne proapoptotyczne działanie jedynie na komórki raka. W fibroblastach, obok braku indukcji apoptozy zaobserwowano indukcję procesu starzenia i nasiloną ekspresję ORP150.

Kolejny kierunek badawczy podejmowany przez Habilitanta dotyczył **wpływu stresu oksydacyjnego, wywołanego nadtleniem wodoru i tert-butylem, na fibroblasty skóry ludzkiej**. W tym nurcie skoncentrowano uwagę na naturalnych związkach m. in. anetol. Zaobserwowano, że fibroblasty w warunkach stresu syntetyzowały znacząco mniej białek kolagenowych i charakteryzowały się zwiększoną apoptozą w porównaniu z kontrolą. Anetol w stężeniu 0,5 μ M okazał się czynnikiem protekcyjnym przed stresem oksydacyjnym co przejawiało się w jego przeciwdziałaniu apoptozie i nasilaniu syntezy kolagenu. Wykazano również, że traktowanie komórek H₂O₂ nasila aktywność MMP-2 i MMP-9 oraz aktywność egzoglikozydaz z wyjątkiem β -glukuronidazy (prace P2 i P7).

Kolejny kierunek dotyczył badania żywotności komórek raka jelita grubego (linia DLD-1) pod wpływem metronidazolu, chemioterapeutyku o udokumentowanym działaniu pierwotniako- i bakteriobójczym, wobec drobnoustrojów beztlenowych. Zaobserwowano nasilanie procesu apoptozy (praca P4).

W 2014r. Habilitant uzyskał stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Regulacyjna rola białka opiekuńczego ORP150 w metabolizmie kolagenu w komórkach raka sutka linii MCF-7”, który przedstawił Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Promotorem rozprawy doktorskiej była prof. dr hab. Marzanna Cechowska-Pasko a recenzentami prof. Jerzy Pałka i prof. Wojciech Mielicki.

Omówienie osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe Habilitanta pt.: „Efekty działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenku grafenu na wybrane komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*” składa się z cyklu 4 prac oryginalnych o sumarycznym IF wynoszącym 22,128 pkt. i punktacji MEiN 455 pkt. (520 pkt. MNIŚzW z 2021r.). Zaprezentowane prace są dobrze wyselekcjonowane, charakteryzują się wysokimi współczynnikami oddziaływania, stanowią spójną całość i posiadają elementy nowości naukowej. Do osiągnięcia zostały wybrane prace eksperymentalne opublikowane w latach 2017 - 2023 w *Nanomaterials*: 2017: 7, 8, E230, 22 pp. (IF=3,504; pięciu współautorów); *International Journal of Molecular Sciences*: 2021: 22, 22, 17 pp. (IF=6,208; dwóch współautorów); *International Journal of Molecular Sciences*: 2022: 23, 16, 20 pp. (IF=6,208; jeden współautor) i *International Journal of Molecular Sciences*: 2023: 24, 3, 14 pp. (IF=6,208; dwóch współautorów). We wszystkich pracach osiągnięcia naukowego dr Rafał Krętowski jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. W ww. pracach swój udział procentowy ocenia kolejno na 70%, a w następnych trzech pracach na 80%.

Osiągnięcie naukowe dotyczy działania nanocząstek krzemionki (SiNPs) i zredukowanego tlenku grafenu (rGO) na komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*. Ze względu na unikalne właściwości fizykochemiczne nanocząstek stały się one bardzo obiecujące w poszukiwaniu nowych terapii przeciwnowotworowych. Habilitant w przedstawionym do oceny osiągnięciu naukowym postawił dwa główne cele. W pierwszym analizuje profil nanotoksykologicznego działania rGO i SiNPs na wybranych liniach komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowej linii fibroblastów, a w drugim bada efekty biologicznego działania, wybranych nanomateriałów w analizowanych liniach komórkowych, determinujących obserwowany efekt cytotoksyczny.

W pierwszej pracy z cyklu H1 (*Nanomaterials*: 2017: 7, 8, E230, 22 pp.) dr R. Krętowski swoje działania rozpoczął od oceny efektów komórkowych i molekularnych działania nanocząstek krzemionki (SiNPs) na ludzkie komórki glejaka wielopostaciowego mózgu. W pierwszym kroku wykazał różnicę w wartości potencjału zeta ζ i rozmiarach SiNPs w zależności od ośrodka dyspersyjnego. Następnie, w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu w hodowli *in vitro* (linia LBC3 i LN-18) oraz kontrolnych fibroblastach skóry ludzkiej (CRL-1474) określił cytotoksyczność testem MTT, trzech różnej wielkości nanocząstek krzemionki (SiNPs): 7nm, 5–15 nm oraz 10–20 nm w dawkach wzrastających od 12,5 μ g/ml do 1000 μ g/ml. Najbardziej efektywnie okazały się nanocząsteczki krzemionki (SiNPs) o stężeniu 50 μ g/ml i 100 μ g/ml i rozmiarze w przedziale od 5 do

15 nm. Jak wykazano za pomocą analizy ilościowej ekspresji genów (QRT-PCR) w komórkach LBC3 poziomy mRNA dla genów proapoptotycznych *Bim*, *Bax*, *Puma* i *Noxa* uległy znacznemu zwiększeniu w odniesieniu do poziomu ekspresji genu metabolizmu podstawowego *RPL13a*. Wynik ten został potwierdzony w badaniu aktywności kaspazy-9. Zaobserwowano, indukcję cytotoxyczności zależną od dawki i czasu wywołaną SiNPs w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu czego nie obserwowano w komórkach fibroblastów skóry ludzkiej. Dalsze badania metodą cytometrii przepływowej z użyciem aneksyny V znakowanej FITC oraz PI pozwoliły Habilitantowi na potwierdzenie indukcji apoptozy w komórkach glejaka (linia LBC3) poddanych traktowaniu SiNPs i nekrozy w komórkach LN-18. Ponadto wykazano, że SiNPs w komórkach LBC3 obniża potencjał błony mitochondrialnej powodując jej deformację.

Aktywację procesu autofagii w komórkach LBC3 wykazano poprzez wzrost stosunku LC3-II/LC3-I wykorzystując technikę Western blot. Wynik ten potwierdzono techniką QRT-PCR obserwując zwiększony poziom ekspresji genu *Atg5* jak również techniką mikroskopową w której obserwowano, po barwieniu komórek bromkiem etydyny i oranżem akrydyny, w kompartmentie cytozolowym tworzenie autofagosomów. Habilitant wykazał również zależny od czasu i dawki wzrost liczby komórek z kwaśnymi organellami pęcherzykowymi (AVOs) po ich traktowaniu SiNPs o wyselekcjonowanej wielkości.

W podsumowaniu tej pracy można stwierdzić, że Habilitant dobrze udokumentował inhibicję wzrostu komórek glejaka wielopostaciowego mózgu przez nanocząstki krzemionki (SiNPs) o wielkości 5 – 15 nm na drodze indukowanej apoptozy i autofagii.

W kolejnej pracy włączonej do osiągnięcia naukowego H4 (**Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 2037**) dr R. Krętowski analizuje możliwy wpływ wyselekcjonowanych nanocząstek krzemionki (SiNPs), tym razem na komórki raka sutka – estrogeniezależna linia MDA-MB-231 (ER-) oraz estrogenozależna linia ZR-75-1 (ER+). Nanocząstki SiNPs, o wielkości 5–15 nm, w stężeniu 100 µg/ml, zmniejszały żywotność obu typów komórek. Kolejnym krokiem było zbadanie wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, peroksydacji lipidów – TBARS i zawartości grup tiolowych -SH wraz z określeniem stosunku GSH/GSSG w obu ww. liniach komórek raka sutka. Habilitant wykazał indukcję syntezy RFT pod wpływem SiNPs oraz obniżenie poziomu grup -SH, markera uszkodzeń oksydacyjnych białek, a także nasilenie peroksydacji lipidów (TBARS) i obniżenie stosunku glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG). Następstwem wzmożonej syntezy RFT było nasilenie stresu oksydacyjnego i w konsekwencji indukcja cytotoxyczności i apoptozy badanych komórek. SiNPs, w komórkach linii ZR-75-1 redukowały potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\Psi_m$, a w komórkach linii MDA-MB-231 i ZR-75-1 aktywowały kaspazę-9 oraz kaspazę-3. Ciekawą wydaje się obserwacja, że wstępne traktowanie komórek 5 mmol/l N-acetylo-L-cysteiną (NAC) redukuje stres oksydacyjny – obserwowano obniżenie RFT, ilości TBARS, zwiększenie stosunku GSH/GSSG i zawartości grup tiolowych i obniżenie cytotoxyczności wywołanej przez SiNPs.

Kolejną badaną przez Habilitanta nanocząsteczką był zredukowany tlenek grafenu (rGO). Wyniki tych badań zostały upublicznione w H2, H3 - **Int J Mol Sci. 2021, 22;22(22):12593; Int J Mol Sci. 2022, 18;23(16):9285.**

W pierwszej pracy (H2) oceniono wpływ rGO na cytotoxyczność, zmiany morfologii, proliferację, stres oksydacyjny i apoptozę w szeregu linii komórkowych raka gruczołu sutkowego (T-47D, MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 oraz HS 578T) hodowanych *in vitro*. Ocenę cytotoxyczności oparto o test z dehydrogenazą mleczanową (LDH) jak również w oparciu o ocenę integralności błony komórkowej na cytometrze przepływowym z użyciem jodku propidyny (PI). Dwie linie komórkowe (estrogeniezależna MDA-MB-231 i estrogenozależna ZR-75-1) spośród badanych po traktowaniu rGO, w zakresie stężeń rGO od 25 µg/ml do 300 µg/ml, oceniane po 24 h i 48 h inkubacji uwalniały w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji LDH i zwiększały wychwyty PI i one zostały wyselekcjonowane do dalszych badań. Polegały one na ocenie wpływu rGO na poziom peroksydacji lipidów, stosunek glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG) oraz poziom grup tiolowych (-SH). Habilitant udowodnił wpływ rGO na nasilenie poziomu peroksydacji lipidów

(TBARS) i obniżenie stosunku GSH/GSSG, obniżenie zawartości grup tiolowych i wzrost wytwarzania RFT w obu wyselekcjonowanych do badań liniach komórkowych. Dalsze badania cytometryczne komórek z użyciem barwnika fluorescencyjnego DAPI jednoznacznie wskazały, że komórki MDA-MB-231 i ZR-75-1 wykazywały typowe zmiany występujące w morfologii komórek apoptotycznych. Barwienie fioletem krystalicznym pozwoliło wykazać indukcję zmian w obszarze błony komórkowej jak i jądra komórkowego wskazujące na zapoczątkowanie procesu apoptozy.

W pracy H3 badania kontynuowano na komórkach raka gruczołu sutkowego linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Zakres stężeń rGO wynosił od 10 µg/ml do 300 µg/ml, i zastosowano ten sam czas inkubacji komórek z badanymi nanocząstkami rGO, który wynosił 24 h i 48 h. Najbardziej efektywne działanie zaobserwowano dla rGO w stężeniu 100 µg/ml. rGO powodował zależną od czasu i dawki redukcję żywotności obu badanych linii komórek raka gruczołu sutkowego. Po traktowaniu komórek kontrolnych trzykrotnie wyższą dawką rGO, fibroblasty skóry ludzkiej linia CRL1474, tylko nieznacznie zmniejszały swoją żywotność. Obserwowanemu efektowi cytotoksycznemu towarzyszył wzrost RFT w obu badanych liniach komórkowych. Habilitant dowiódł, że nanocząstki rGO indukowały apoptozę na drodze mitochondrialnej, obniżały potencjał błony mitochondrialnej indukując zmiany morfologiczne komórek. Te obserwacje zostały potwierdzone techniką Western blot, która pozwoliła wykazać w komórkach traktowanych rGO wzrost poziomu białka Bax i obniżenie poziomu białek Bcl-xl i Bcl-2 oraz badaniu dokumentującym wzrost aktywności kaspazy-9, kaspazy-3 jak i wzrost poziomu białka PARP. Po zaobserwowaniu spadku poziomu czynnika transkrypcyjnego NF-κB w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1, pod wpływem rGO Habilitant sugeruje możliwość indukcji apoptozy przez hamowanie podjednostki białkowej P65 czynnika NF-κB. Dalsza cytometryczna analiza cyklu komórkowego wykazała podwyższony odsetek komórek raka gruczołu sutkowego w fazie S i subG1, co także może świadczyć o indukcji procesu apoptozy. Dalszych dowodów świadczących o zatrzymaniu cyklu komórkowego dostarczyła analiza Western blot dokumentująca wzrost poziomu białka P21 w obu badanych liniach komórkowych i wzrost poziomu białka P53 w komórkach linii ZR-75-1.

Obok udokumentowania nasilonego procesu apoptozy w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1 Habilitant obserwuje w badanych liniach komórek raka gruczołu sutkowego pod wpływem rGO zwiększone poziomy białek związanych z indukcją procesu autofagii (Atg5 i LC3I/II).

Podsumowując osiągnięcie naukowe dr R. Krętowskiego warto podkreślić że realizowana tematyka badawcza wnosi elementy nowości naukowych do których zaliczyć można identyfikację molekularnych mechanizmów działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenu grafenu na komórki nowotworowe w hodowlach *in vitro*. Wykazanie wybiórczego hamowania proliferacji komórek nowotworowych, również tych wykazujących lekooporność, przez SiNPs oraz rGO co może dawać nadzieje na ich potencjalne wykorzystanie jako nanochemioterapeutyków. Wykazanie, że mechanizm działania SiNPs oraz rGO polega na indukcji apoptozy i autofagii w komórkach nowotworowych różnych molekularnych podtypów.

Prace wybrane przez Habilitanta są wieloautorskie. Współautorzy swoimi podpisami potwierdzili zgodę na ich wykorzystanie w osiągnięciu naukowym dr R. Krętowskiego. Z analizy oświadczeń Habilitanta jak i współautorów wynika że wkład Habilitanta w ich przygotowanie i upublicznienie był wiodący. We wszystkich pracach był On pierwszym i korespondencyjnym autorem, wykonawcą większości przeprowadzonych eksperymentów, był autorem koncepcji, analizował i interpretował uzyskane wyniki. Nie należy jednak minimalizować wkładu innych członków zespołu, którzy wykonywali żmudne oznaczenia za pomocą nowoczesnych technik biologii molekularnej oznaczając poziomy ekspresji genów techniką QRT-PCR, czy charakteryzując nanocząstki krzemionki i analizując potencjał zeta, zmiany ultrastrukturalne w komórkach nowotworowych z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego czy oznaczając parametry stresu oksydacyjnego. Możliwość przeprowadzenia tak szerokich analiz świadczy o umiejętności dr R. Krętowskiego bycia liderem grupy, który potrafi stworzyć zespół badawczy w celu realizacji koncepcji naukowej.

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, dorobek naukowy Habilitanta uległ znaczącemu powiększeniu. Jak wynika z analizy bibliometrycznej obejmuje on lata 2015 – 2023 i w tym okresie opublikowane zostały 21 prace posiadające sumaryczny IF wynoszący 95,245 i punktację MEiN równą 1655 pkt. Analiza tematyki prac pozwala na wyróżnienie kilku ścieżek badawczych:

1. Ocena wpływu stresu siateczki śródplazmatycznej na wybrane linie komórkowe

W publikacji [P9] Krętowski R, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Efficient apoptosis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line. *Mol Cell Biochem.* 2015;398(1-2):165-73, wykazano, że bortezomib powodował śmierć komórek raka jelita grubego linii DLD-1 na drodze apoptozy i nekrozy.

W świetle faktu, stosowania bortezomibu w leczeniu szpiczaka i braku tego typu danych w innych typach nowotworów podejmowanie prób wyjaśnienia jego mechanizmu działania w innych nowotworach (rak jelita grubego, rak sutka) jest uzasadniony. Wątek związany z wyjaśnieniem mechanizmu działania bortezomibu na apoptozę komórek raka sutka linii MDA-MB-231 w odniesieniu do prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej (linia CRL-1474) został omówiony w pracach [P5 i P6] dorobku przed uzyskaniem stopnia doktora.

W kolejnej pracy ze współautorstwem Kandydata [P22] Omeljaniuk WJ, Krętowski R, Ratajczak-Wrona W, Jabłońska E, Cechowska-Pasko M. Novel Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Apitolisib (GDC-0980), Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;26;22(21):11511 zbadano apitolisib (GDC-0980) obiecujący nowatorski chemioterapeutyk o podwójnym działaniu hamującym aktywność PI3K/mTOR na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu (linia A-172). Udowodniono, że indukował on zależną od czasu i dawki cytotoksyczność jak również nasilał proces apoptozy.

2. Ocena wpływu deacetylaz histonów na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu

W kolejnych pracach ze współudziałem Habilitanta [P10] Kusaczuk M, Krętowski R, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor - belinostat - in glioblastoma cell lines: a preliminary report. *Invest New Drugs.* 2016;34(5):552-64 i [P12] Kusaczuk M, Krętowski R, Bartoszewicz M, Cechowska-Pasko M. Phenylbutyrate-a pan-HDAC inhibitor-suppresses proliferation of glioblastoma LN-229 cell line. *Tumour Biol.* 2016;37(1):931-42 uwagę skoncentrowano na inhibitorach deacetylaz histonów (fenylomaślan - PBA i belinostat - Bel). Oceniono ich wpływ na przeżywalność komórek glejaka wielopostaciowego mózgu. Zaobserwowano cytotoksyczne działanie PBA jak i indukcję apoptozy i zatrzymanie cyklu komórkowego w hodowli komórek linii LN229 i brak takiego efektu dla komórek LN-18. Interesujące dane dotyczyły badania poziomów wybranych białek techniką cytometrii przepływową, Western blot a także poziomów ekspresji genów kodujących analizowane białka w których wykazano wpływ PBA na wzrost poziomu białka P21 i brak modulowania poziomu białka P53. Wykazano także, że traktowanie komórek PBA powoduje obniżenie ekspresji genów antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-XL) i brak wpływu na poziomy genów proapoptotycznych (Bax i Bim).

Z kolei belinostat (Bel) w komórkach LN-229 indukował apoptozę i nasilał ekspresję proapoptotycznych genów *Puma*, *Bim*, *Chop* i *P21*. W komórkach linii LN-18 zaobserwowano jedynie wzrost P21. W komórkach LN-229 traktowanych Bel zaobserwowano wzrost poziomów białek opiekuńczych z rodziny GRP78 i GRP94. W obu liniach komórkowych (LN-18 i LN-229) zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego.

3. Ocena wpływu nanocząstek krzemionki na komórki nowotworowe.

Ten kierunek badań zasługuje na szczególną uwagę ze względu na możliwe wykorzystanie nanocząstek jako innowacyjnych środków leczniczych, które są obiecujące w rozwoju diagnostyki, obrazowania, a także w rozwoju terapii przeciwnowotworowych. W pracach [P16] Kusaczuk M, Krętowski R, Naumowicz M, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in

glioblastoma cells. Int J Nanomedicine. 2018;12;13:2279-2294 i [P23] Krętowski R, Kusaczuk M, Naumowicz M, Cechowska-Pasko M. The Pro-Apoptotic Effect of Silica Nanoparticles Depends on Their Size and Dose, as Well as the Type of Glioblastoma Cells. Int J Mol Sci. 2021;30;22(7):3564 wykazano, że nanocząstki krzemionki (SiNPs) zależnie od wielkości i dawki a także czasu ekspozycji działają cytotoksycznie na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu poprzez generowanie RFT z następującą indukcją procesów apoptozy i nekrozy. W powyższych pracach wyselekcjonowano SiNPs, o najlepszej efektywności (wielkość 5–15 nm), oraz wykazano, że w zależności od warunków ekspozycji, wielkości i dawki, i typu komórek glejaka wielopostaciowego mózgu, mogą one wyzwalać zróżnicowane efekty komórkowe/molekularne.

4. Związki naturalne o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym

Kolejny problem badawczy w który włączył się Habilitant dotyczy związków pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwnowotworowym. Zagadnienia te zostały upublicznione w pracach:

[P15] Kruszewski M, Kusaczuk M, Kotyńska J, Gál M, Krętowski R, Cechowska-Pasko M, Naumowicz M. The effect of quercetin on the electrical properties of model lipid membranes and human glioblastoma cells. Bioelectrochemistry. 2018;124:133-141.

[P18] Naumowicz M, Kusaczuk M, Kruszewski MA, Gál M, Krętowski R, Cechowska-Pasko M, Kotyńska J. The modulating effect of lipid bilayer/p-coumaric acid interactions on electrical properties of model lipid membranes and human glioblastoma cells. Bioorg Chem. 2019;92:103242

[P25] Kusaczuk M, Krętowski R, Naumowicz M, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. A Preliminary Study of the Effect of Quercetin on Cytotoxicity, Apoptosis, and Stress Responses in Glioblastoma Cell Lines. Int J Mol Sci. 2022;25;23(3):1345.

Udokumentowano w nich, że kwercetyna jak również kwas p-kumarowy wykazują działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek glejaka wielopostaciowego mózgu w hodowli poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego z następującym procesem apoptozy. Zaobserwowano również wpływ badanych związków naturalnych na przepuszczalność i ładunek powierzchniowy błony komórkowej komórek glejaka.

Dr R. Krętowski jest współautorem 16 doniesień zjazdowych prezentowanych w okresie od 2010 do 2014 (przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 18 z okresu 2016 do 2019 (po uzyskaniu stopnia doktora) z których 6 zaprezentował na zjazdach międzynarodowych i 18 na zjazdach krajowych. Warto podkreślić aktywność naukową dr R. Krętowskiego jako studenta co zostało udokumentowane Jego wystąpieniem ustnym na Trzeciej Międzynarodowej Konferencji Naukowej Studentów Medycyny i Młodych Doktorów w Białymstoku w roku 2007.

Analiza bibliometryczna

Z podsumowania analizy bibliometrycznej publikacji autorstwa dr R. Krętowskiego opracowanej przez Dyrektora Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku mgr Danutę Dąbrowską-Charytoniuk na dzień 13 lutego 2023 roku wynika, że w dorobku naukowym Habilitanta znajduje się 28 prac posiadających IF o łącznej wartości 106,963 i punktacji MEiN wynoszącej 1796 pkt. **Liczba cytowani 170 bez autocytoowań 142 indeks H wynosi 9 wg. bazy Scopus.**

Nagrody naukowe:

Działalność naukowa dr R. Krętowskiego w latach 2012 – 2021 była wyróżniana przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku jednokrotnie zespołową oraz indywidualnymi nagrodami I stopnia – pięciokrotnie i III stopnia - trzykrotnie.

W roku 2012 dr R. Krętowski został stypendystą Europejskiego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki: „Studiuje, badam, komercjalizuję – program wsparcia doktorantów UMB”. Stypendium współfinansowane przez Unię Europejską, w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (1.10.2012r. do 30.09.2013r.)

Projekty badawcze

Działalność naukowa dr R. Krętowskiego była głównie finansowana ze środków statutowych. Przed uzyskaniem stopnia doktora kierował czterema tematami w latach 2011 do 2014. W latach 2010 -2014 był także współwykonawcą w 10 projektach finansowanych w ramach działalności statutowej. Po uzyskaniu stopnia doktora w okresie 2015 - 2023 kierował 5 projektami, kolejny, szósty jest w toku realizacji. Był także wykonawcą w 19 projektach finansowanych z dotacji statutowej. Dwa zadania badawcze z roku 2023 są jeszcze realizowane. Tematyka tych zadań znalazła odzwierciedlenie w publikacjach, które zostały już omówione.

Po uzyskaniu stopnia doktora Kandydat był **współwykonawcą** w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) – PRELUDIUM 9 zatytułowanym: „Wpływ kwasu tauroursodeoksycholowego (TUDCA) na redukcję stresu śródplazmatycznego w komórkach chondrocytów jako nowy potencjalny kierunek wspomagania funkcjonowania chrząstki stawowej” o numerze 2015/17/N/NZ7/01094 realizowanym w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Aplikował z sukcesem do Narodowego Centrum Nauki (NCN) – o grant MINIATURA 2 (2018/02/X/NZ3/00030), pt.: „Zredukowany tlenek grafenu (rGO) jako czynnik indukujący hipoksję oraz modulator apoptozy w komórkach raka sutka inkubowanych w obecności inhibitora proteasomów”. Projekt został zakończony i rozliczony.

Staż naukowe

Dr R. Krętowski odbył szereg, krótkoterminowych staży naukowych w ośrodkach polskich, podczas których opanowywał techniki badawcze niezbędne w realizowaniu swoich zadań naukowych m. in. na Wydziale Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu gdzie doskonalił swój warsztat w zakresie prowadzenia hodowli komórkowych, metod spektrofotometrycznych wykorzystywanych w analizie homeostazy komórkowej oraz w bioobrazowaniu komórek nowotworowych przy użyciu technik mikroskopii konfokalnej.

Kolejny staż w Centrum Innowacji Badań i Nauki w Lublinie, dotyczący poszukiwania roślinnych substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym oraz roślinnych substancji i surowców zapachowych, metod oznaczania jakości surowców farmaceutycznych i kwalifikacji farmakopealnej.

W okresie od 2009 do 2023 r. podnosił swoje kompetencje zawodowe biorąc udział w 10 szkoleniach, 3 seminariach, 2 warsztatach i 2 kursach.

Odbycie ww. staży, szkoleń, warsztatów i kursów pozwoliło Habilitantowi na opanowanie solidnego warsztatu metodycznego do którego można zaliczyć takie metody badawcze jak: hodowla komórek *in vitro*, cytometria przepływowa, analiza rozkładu wielkości, objętości oraz liczby komórek, bioobrazowanie metodą mikroskopii fluorescencyjnej, hodowlę guzów nowotworowych *in ovo*, analizę elektroforetyczną białek z ich identyfikacją techniką Western blot oraz ilościową metodę badania poziomu ekspresji genów w czasie rzeczywistym – QRT-PCR.

Niestety Habilitant nie odbył żadnego stażu w ośrodku zagranicznym, jednak Jego dorobek naukowy jest rozpoznawany w gremiach międzynarodowych o czym mogą świadczyć zaproszenia do recenzowania publikacji w takich czasopismach jak: Antioxidants, Biomolecules, Cancers, Cells, International Journal of Nanomedicine, Nanomaterials, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, Veterinari Science.

Współpraca z sektorem gospodarczym

Dr R. Krętowski był wykonawcą prac badawczo-rozwojowych w których oceniano wpływ nanowody na wybrane parametry wzrostu komórek raka jelita grubego linii DLD-1, białaczki limfoblastycznej linii MOLT-4 oraz fibroblastów, wykonywanych na zlecenie firmy STOMADENT, Zdzisław Oszczyda z siedzibą w Bolesławcu.

Habilitant jest także współautorem patentu krajowego: Niemirowicz Katarzyna, Car Halina, Krętowski Rafał, Cechowska-Pasko Marzanna, Wilczewska Agnieszka Zofia. Numer patentu: 232982 – Sposób otrzymywania i zastosowania multifunkcjonalnego nanosystemu. Polska, Urząd Patentowy RP.

Współpraca naukowa

Habilitant prowadził badania we współpracy z zespołem kierowanym przez prof. dr hab. Agnieszka Zofia Wilczewską, kierownika Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku w zakresie badań nanocząstek magnetycznych z powłoką aminosiloksanową (MNP@NH₂) i ich pochodnymi zawierającymi kwas foliowy (MNP@NH-FA). W prowadzonych badaniach wykazano, że nanosystemy MNP@NH₂ i MNP@NH-FA w hodowli komórek raka jelita grubego linii DLD-1 ulegają internalizacji, a lokując się w jądrze komórkowym indukują apoptozę komórek. Z kolei zawarty w nanosystemach kwas foliowy powodował przyspieszoną eliminację nanostruktur z ksenograftów wszczepionych do organizmu myszy, które powodowały redukcję masy guza i nasiloną ekspresję aktywnej formy kaspazy-3 w modelu mysim (załącznik 4, pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P13) - (Niemirowicz K., Car H., Sadowska A., Wątek M., Krętowski R., Cechowska-Pasko M., Wilczewska A. Z., Mystkowska J., Kasacka I., Torres A., Bucki R. Pharmacokinetics and anticancer activity of folic acid-functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*: 2017: 13, 6, s. 665-677.

Współpraca ta zaowocowała wspólnym patentem dotyczącym sposobu otrzymywania multifunkcjonalnego nanosystemu z rdzeniem z materiału magnetycznego i powłoką z polimeru. Otrzymane multifunkcjonalne nanocząstki miały dualistyczny charakter, magnetyczny oraz fluorescencyjny. Wnikały one do komórek i lokalizowały się w jądrach komórkowych. Otrzymany multifunkcjonalny nanosystem umożliwia terapię celowaną lub detekcję komórek, w szczególności tych zmienionych nowotworowo (załącznik 4, pkt 3, ppkt 3) - Niemirowicz Katarzyna, Car Halina, Krętowski Rafał, Cechowska-Pasko Marzanna, Wilczewska Agnieszka Zofia. Numer patentu: 232982 – Sposób otrzymywania i zastosowania multifunkcjonalnego nanosystemu. Polska, Urząd Patentowy RP.

Habilitant współpracował również z prof. dr hab. Beatą Kolesińską, kierownikiem Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Współpraca pozwoliła na wyselekcjonowanie z grupy nowych pochodnych 1,3,5-triazyny związku f12 z trzema grupami 2-chloroetyloaminowymi, który w 3 liniach komórkowych glejaka wielopostaciowego (LBC3, LN-18 oraz LN-229) indukował zależną od czasu i dawki cytotoksyczność i apoptozę (załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P19) - Krętowski Rafał, Drozdowska Danuta, Kolesińska Beata, Kamiński Zbigniew, Frączyk Justyna, Cechowska-Pasko Marzanna. The cellular effects of novel triazine nitrogen mustards in glioblastoma LBC3, LN-18 and LN-229 cell lines. *Investigational New Drugs*: 2019: 37, 5, s. 984-993.

Bardzo owocną okazała się współpraca Kandydata z dr hab. Agatą Jabłońską-Trypuć z Katedry Chemii, Biologii i Biotechnologii Politechniki Białostockiej, której efekty zostały zaprezentowane jako osiągnięcie naukowe dr R. Krętowskiego. Koncentrowała się ona na kilku aspektach, z których pierwszy dotyczył oceny parametrów stresu oksydacyjnego w komórkach glejaka wielopostaciowego oraz raka gruczołu sutkowego pod wpływem nanocząstek krzemionki (SiNPs) i zredukowanego tlenku grafenu (rGO) (załącznik 4, pkt I, ppkt 2, publikacja H-2 i H-4 osiągnięcia naukowego). A kolejny rozwiązywany wspólnie problem badawczy dotyczył określenia wpływu nowych pochodnych, kompleksów doksorubicyny (DOX) z metalami (Mg, Mn, Co, Ni, Fe, Cu, Zn) na apoptozę, cykl komórkowy, żywotność, proliferację i cytotoksyczność w komórkach raka sutka linii MCF-7. W badaniach wyselekcjonowano kompleksy z DOX z Mg, Mn i Ni (Mg-DOX, Mn-DOX, Ni-DOX), które działały efektywnie w stężeniu 0,5 μM. Badania wykazały, że doksorubicyna w kompleksie z określonymi metalami może być bardziej skuteczna od samej doksorubicyny (załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P14) - Jabłońska-Trypuć Agata, Świdorski Grzegorz, Krętowski Rafał, Lewandowski Włodzimierz. Newly synthesized doxorubicin complexes with selected metals-synthesis, structure and anti-breast cancer activity. *Molecules*: 2017: 22, 7, E1106, 21pp.

W kolejnym zadaniu realizowanym we współpracy, zwrócono uwagę na możliwość zmniejszania niekorzystnego działania DOX, indukującej stres oksydacyjny w fibroblastach skóry ludzkiej, poprzez inkubację komórek ze związkami polifenolowymi takimi jak kwas cykoriowy (CA). Dowiedziono, że połączenie DOX z CA wykazywało działanie cytoprotekcyjne, które jak sugerują Autorzy może być wykorzystane do niwelowania zgubnych skutków stresu oksydacyjnego innych chemioterapeutyków (załącznik 4 pkt II, ppk 4B, publikacja nr P17) - Jabłońska-Trypuć Agata, Krętowski Rafał, Kalinowska Monika, Świdorski Grzegorz, Cechowska-Pasko Marzanna, Lewandowski Włodzimierz. Possible mechanisms of the prevention of doxorubicin toxicity by cichoric acid antioxidant nutrient. *Nutrients*: 2018: 10, s. E44 21pp.

W realizowanych we współpracy badaniach kwasu traumatycznego (TA) wykazano jego wpływ na hamowanie proliferacji i obniżanie żywotności komórek oraz nasilenie aktywności kaspazy-7. Efektem wyżej opisanych badań jest publikacja (załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P20) - Jabłońska-Trypuć Agata, Krętowski Rafał, Wołejko Elżbieta, Wydro Urszula, Butarewicz Andrzej. Traumatic acid toxicity mechanisms in human breast cancer MCF-7 cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*: 2019: 106, s. 137-146.

Kolejny ciekawy wynik będący efektem współpracy dotyczył oceny wpływu kwasu cykoriowego (CA) na możliwość eliminacji stymulującego działania pestycydów (mezotrion) na komórki czerniaka (linia A-375) i toksycznego wpływu herbicydów na komórki prawidłowe skóry ludzkiej – fibroblasty (CRL-1474). Jak wykazano sam mezotrion stymulował żywotność komórek czerniaka, a w połączeniu z CA była ona znacząco zmniejszana. CA hamował prooksydacyjną i proapoptotyczną aktywność mezotrionu w fibroblastach (załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P21) - Jabłońska-Trypuć Agata, Krętowski Rafał, Świdorski Grzegorz, Cechowska-Pasko Marzanna, Lewandowski Włodzimierz. Cichoric acid attenuates the toxicity of mesotrione. Effect on in vitro skin cell model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*: 2020: 77, Article ID 103375, 12 pp.

Dr R. Krętowski jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.

Działalność dydaktyczna

Stanowiska asystenta, a od roku 2016 adiunkta naukowo-dydaktycznego obowiązywały/obligują dr R. Krętowskiego do prowadzenia zajęć ze studentami. Habilitant zaangażowany jest w prowadzenie ćwiczeń z Biochemii dla studentów III roku kierunku Farmacja, II roku kierunku Analityka Medyczna, II roku kierunku Kosmetologia oraz I roku kierunku Dietetyka.

Kandydat opracował program i prowadzi zajęcia fakultatywne dla studentów V roku Analityki Medycznej pt.: „Techniki zakładania i prowadzenia hodowli komórkowych”. Opracował program i prowadzi seminaria dla studentów II roku kierunku Kosmetologia pt.: „Budowa i organizacja macierzy pozakomórkowej: kolagen”, oraz „Budowa, transport i transdukcja sygnału przez błony biologiczne”. Dla studentów III roku Szkoły Doktorskiej UMB prowadzi zajęcia praktyczne pt.: „Cytometria przepływowa - możliwości zastosowania w badaniach biomedycznych i farmaceutycznych”. Jest także opiekunem doktorantki mgr Wiktorii Piskorz (II rok Szkoły Doktorskiej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku). Był kierownikiem 5-ciu realizowanych w zakładzie prac magisterskich.

Działalność organizacyjna

Dr R. Krętowski aktywnie włączał się w działalność organizacyjną Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku m.in. wchodził w skład Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej (lata 2010 – 2017). W Zakładzie współorganizował Pracownię Hodowli Komórkowych i Mikroskopii Fluorescencyjnej.

W latach 2017 i 2018 prowadził warsztaty „Metody hodowli i immunofluorescencyjnej analizy komórek nowotworowych” w ramach XV i XVI Podlaskiego Festiwalu Nauki i Sztuki.

Uwagi

Dość często w autoreferacie dr R. Krętowski pisze o badaniu ekspresji białka (np. str. 12, 21), sugerowałbym odnoszenie się do poziomu stężenia białka, poziom ekspresji dotyczy genu na poziomie mRNA. Podobnie, stosowane przez Habilitanta określenie rak sutka zamieniłbym na rak gruczołu sutkowego.

Habilitant nie odbył stażu zagranicznego i nie nawiązał kooperacji naukowej z ośrodkiem zagranicznym.

Podsumowanie

Podsumowując osiągnięcie naukowe dr Rafała Krętowskiego należy podkreślić spójność wyselekcjonowanych prac, Jego rolę lidera w tworzenie koncepcji, zaprezentowania wyników wnoszących nowe elementy w rozwój badań związanych z poszukiwaniem nowych metod diagnozowania i terapii nowotworów. W celu rozwiązania problemu naukowego Habilitant potrafił nawiązywać kooperacje i prowadzić badania wielotorowo z zespołami zajmującymi się badaniami nanocząstek o charakterze dualistycznym - magnetycznym i fluorescencyjnym, syntezą nowych pochodnych z grupy 1,3,5-triazyny czy kwasu traumatynowego (TA), nanocząstek krzemionki (SiNPs) i zredukowanego tlenku grafenu, kompleksów doksorubicyny (DOX) z metalami (Mg, Mn, Co, Ni, Fe, Cu, Zn) oraz związkami o potencjalnych możliwościach zmniejszenia niekorzystnego działania (DOX i mezotrión) jak kwas cykoriowy (CA). Opanował szereg nowoczesnych technik badawczych do których zaliczyć można m. in. hodowlę komórek *in vitro* wraz metodami ich analizy takimi jak cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna, analizy immunologiczne z wykorzystaniem czynnika mikroptytek i technikę Western blot, analizę rozkładu wielkości, objętości oraz liczby komórek, system do hodowli guzów nowotworowych *in ovo*, a także metodę Real Time PCR.

Oceniana rozprawa habilitacyjna, dorobek naukowy spełniają kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Przedkładam zatem wniosek do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie dr n. med. Rafała Krętowskiego do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski